

На правах рукописи

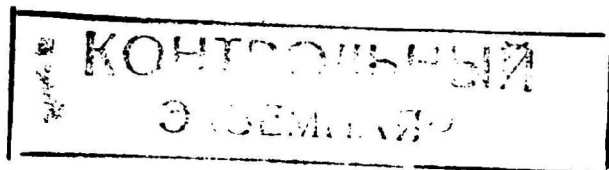
АФЗАЛОВ РАМИЛЬ АГМАЛЬДИНОВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ ПОВТОРНОЙ АКТИВНОСТИ
В НЕРВНО- МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ
ХОЛОДНОКРОВНЫХ**

03.00.13 - физиология человека и животных

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

*диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*



Казань 2000

Работа выполнена на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета.

Научный руководитель— доктор медицинских наук,
профессор **Р.А.Гиниятуллин**

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор **Е.М.Волков**

доктор биологических наук,
доцент **Р.Р.Нигматуллина**

Ведущая организация — Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита состоится “ 27 ” июня 2000г.
в _____ часов на заседании диссертационного Совета К 113.19.02
по присуждению ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.13. - физиология человека и животных
при Казанском государственном педагогическом Университете
по адресу: 420021, г.Казань, ул. Межлаука, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного педагогического Университета по адресу: Казань, ул. Межлаука, 1.

Автореферат разослан “ 24 ” мая 2000г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



870070

Ученый секретарь
диссертационного Совета
кандидат биологических наук,
профессор

И.Ш.Макалеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Нервно-мышечный синапс является высокоспециализированным образованием, предназначенным для быстрой передачи высокочастотных серий нервных импульсов к скелетной мышце. Одним из факторов, обеспечивающих быстрое действие нервно-мышечного синапса, является ограничение длительности пресинаптического потенциала действия системой калиевых ионных каналов двигательной нервной терминали (А.Л.Зефиров, И.А.Халилов, 1985, A.Mallart, 1984; G.Augustine, 1990). В обычных условиях в периферических синапсах один нервный импульс вызывает появление единственного постсинаптического ответа. Однако в центральных синапсах возможна и трансформация ритма импульсов, приводящая к появлению нескольких импульсов в ответ на одиночное раздражение. В последнее время установлено, что калиевые каналы двигательной нервной терминали могут быть объектом модулирующего действия многих биогенных соединений, таких, как сам медиатор ацетилхолин (E.Nevron et al., 1986), газообразный посредник NO (А.Л.Зефиров, Р.Р.Халиуллина, А.А.Анучин, 1999), а также химические факторы окружающей среды, являющиеся продуктами химического производства, например, фенольные соединения (И.А.Халилов, Г.Ф.Ситдикова, А.Л.Зефиров, 1993). Одним из последствий блока калиевых каналов является развитие феномена повторной активности (J.Molgo, 1975, Р.А.Гиниатуллин, 1992). Хотя предполагается, что в его основе лежит продление пресинаптического потенциала действия, однако точная локализация, механизм возникновения и факторы, поддерживающие повторную активность, изучены недостаточно. В частности, есть данные о ретроградном действии эндогенного ацетилхолина (M.Miyamoto, 1979), выходящих из мышечного волокна ионов калия (R.Holfeld, 1981), кальциевых токов нервного окончания (E.Silinsky, 2000), а для ритмогенеза центральных нейронов выявлена ключевая роль ионных каналов, активируемых гиперполяризацией (B.Khakh & J.Henderson, 1998). Поэтому в настоящем исследовании для выяснения места возникновения и механизмов данного феномена в нервно-мышечном препарате лягушки изучали развитие феномена повторной активности, вызванной блокаторами калиевых каналов разного типа.

Цель исследования. Цель – исследовать механизмы возникновения феномена повторной активности в двигательной нервной терминали в нервно-мышечных синапсах холоднокровных.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние блокатора А-типа калиевых каналов 4-аминопиридина на амплитудно-временные характеристики токов концевой пластинки.
2. Изучить влияние ритмической стимуляции на повторную активность.
3. Исследовать влияние ионов Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cd^{2+} на повторную активность.
4. Выяснить роль эндогенного ацетилхолина и постсинаптического тока в развитии повторной активности.
5. Изучить значение ионных каналов, активируемых гиперполяризацией, для развития феномена повторной активности.
6. Исследовать влияние на токи концевой пластинки неспецифического блокатора калиевых каналов тетраэтиламмония и специфического блокатора кальций-активируемых калиевых каналов ибериотоксина.
7. Установить место возникновения повторной активности в нервно-мышечном синапсе.

Научная новизна. Впервые проведено детальное комплексное исследование механизмов повторной активности в нервно-мышечном синапсе лягушки, возникающей при блокировании калиевых каналов. Проанализирована роль потенциалозависимых калиевых каналов А-типа, каналов задержанного выпрямления, гиперполяризационно-активируемых неселктивных ионных каналов в возникновении повторной активности. Показано, что избирательная блокада кальций-активируемых калиевых каналов ибериотоксином при сохраненной активности потенциалозависимых каналов не обладает способностью продуцировать повторную активность. Исследована роль эндогенного ацетилхолина в модуляции повторной активности, впервые установлено, что она осуществляется через α -

бунгаротоксин нечувствительные пресинаптические нейрональные холинорецепторы. Получены новые данные, свидетельствующие против вовлечения ионов калия, выходящих из постсинаптической мембраны, в возникновении повторной активности. Впервые показано, что повторная активность наиболее вероятна при физиологической концентрации ионов калия и кальция в окружающем растворе. С помощью мультieleктродного отведения впервые установлено, что местом возникновения повторной синаптической активности после блока потенциалозависимых калиевых ионных каналов является участок аксона, прилегающий к нервной терминали, в результате протекания локального тока между нервной терминалью и миелинизированным участком аксона, обладающим высокой возбудимостью.

Положение, выносимое на защиту:

Повторная активность в нервно-мышечном синапсе холонокровных возникает в конечной миелинизированной части аксона, прилегающей к нервной терминали, при блокировании потенциалозависимых калиевых каналов и зависит от уровня эндогенного ацетилхолина и от активности гиперполяризационно-активируемых ионных каналов.

Научно-практическая ценность. Полученные в настоящем исследовании данные важны для понимания функциональной организации двигательных нервных окончаний в скелетной мышце. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии иерархической системы калиевых каналов, обеспечивающих быстрое действие синапса и предотвращение искажений двигательных команд мотонейрона. Эта сложная система включает калиевые каналы разных типов (А-типа, задержанного выпрямления, кальций-активируемые), различающиеся по быстроте действия и чувствительности к разным модуляторам. Показана принципиальная возможность возникновения в синапсе пейсмекерной активности пресинаптического происхождения в результате гетерохронного протекания тока между двумя различно организованными частями аксона. Выяснено, что феномен повторной активности может иметь множественные ионные механизмы возникновения и

модулироваться различными синаптическими факторами. Полученные данные важны для понимания особенностей функционирования синапса в условиях блока калиевых каналов биогенными соединениями, такими как нейромедиаторы, гормоны, нейропептиды или токсины промышленного происхождения. Настоящая работа может представлять интерес для физиологов, биофизиков, фармакологов, токсикологов.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на VI Международной школе молодых ученых по биофизике (Ровинь, Хорватия, 1997), на Научно-практической конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 1997), на XVII съезде физиологов России (Ростов-на-Дону, 1998), на V и VI Всероссийских школах молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, 1998, 1999), на научных заседаниях кафедры нормальной физиологии КГМУ и Татарстанского отделения Российского физиологического общества им И.П. Павлова (Казань, 2000).

Реализация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 8 работ. Результаты исследований включены в лекционный курс по нормальной физиологии для студентов Казанского государственного медицинского университета.

Структура и объем диссертации

Диссертация объемом 110 страниц состоит из введения, обзора литературы, изложения методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и содержит 23 рисунка. Список литературы включает 175 работ, из них 26 отечественных и 149 иностранных авторов.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на нервно-мышечных препаратах портняжной и кожно-грудинной мышцы лягушки *Rana ridibunda* в осенне-зимний период. Под эфирным наркозом лягушек декапитировали. Нервно-мышечный препарат выделяли и помещали в ванночку с рабочим объемом 4 мл. Для

предотвращения мышечных сокращений во время регистрации сигналов и сохранения высокого уровня квантового освобождения медиатора мышечные волокна поперечно рассекали (И.Н.Волкова и др., 1975). В течение эксперимента через ванночку непрерывно протекал раствор Рингера, содержащий (в mM): NaCl - 115,0; KCl - 2,5; CaCl₂ - 1,8; Na₂HCO₃ - 11,0; pH 7,2-7,4. Эксперименты проводили при температуре 20±2°C. Внутриклеточное отведение токов концевой пластинки осуществляли стеклянными микроэлектродами, заполненными 2,5 М раствором KCl, с входным сопротивлением 3-5 МОм. Для внеклеточного отведения при регистрации пресинаптических токов нервного окончания (эксперименты проведены совместно с Д.В.Самигуллиным) использовали микроэлектроды с оплавленным кончиком диаметром 2-5 мкм, заполненные 0,5 М раствором NaCl. Накопление и усреднение синаптических сигналов производили при помощи персонального компьютера с периодом опроса 5-20 мкс на точку. Расчет параметров спонтанных и вызванных многоквантовых токов концевой пластинки производили при помощи оригинальных компьютерных программ (автор Т.В.Лайков). Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента и критерию Уилкоксона (Борштейн, 1986).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие 4-аминопиридина на миниатюрные и многоквантовые токи концевой пластинки. При внутриклеточном отведении в условиях фиксации потенциала блокатор А-типа потенциалозависимых калиевых каналов 4-аминопиридин в концентрации 0,1 mM увеличивал амплитуду и постоянную времени спада многоквантовых токов концевой пластинки. К 15 мин действия этого агента увеличение амплитуды составило 205±27%, а продление фазы спада - 240±35% относительно исходного значения (n=6; p<0,05). Более сложным было действие на фазу роста токов. Так, в первую стадию действия 4-аминопиридина, время роста токов уменьшалось до 82±5% к 5 мин, что указывает на первоначальное синхронизирующее действие этого блокатора на вызванную секрецию медиатора. Затем, во вторую стадию, к 20-30 мин действия 4-аминопиридина, наблюдалось увеличение времени роста синаптических токов до

$118 \pm 6\%$. Другими проявлениями асинхронности было увеличение продолжительности фазы спада, она модифицировалась и теряла моноэкспоненциальный характер, появлялись дополнительные пики на спаде сигналов (рис.1А). В половине исследованных синапсов (19/36) в ответ на одиночное раздражение наблюдалось появление повторных токов концевой пластинки (рис.1Б).

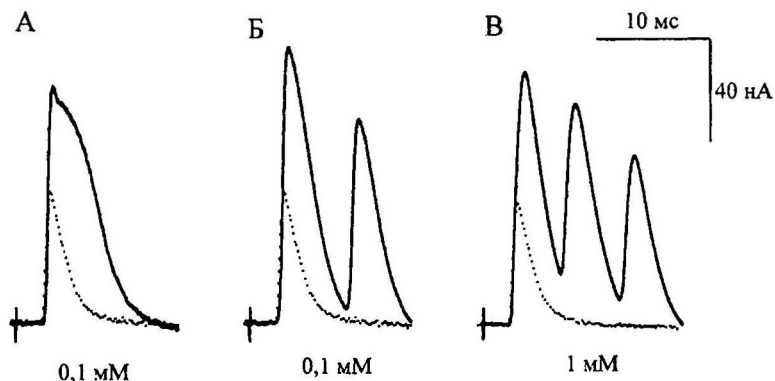


Рис.1. Токи концевой пластинки при действии 4-аминопиридина.
Пунктирная линия - ток концевой пластинки в контроле.

Амплитуда повторных ответов достигала амплитуды первого вызванного тока, а интервал между вызванным и повторным ответами варьировал в диапазоне 3-20 мс. При повышении концентрации 4-аминопиридина до 1 мМ в каждом синапсе регистрировались один-три дополнительных тока (рис. 1В). 4-аминопиридин не оказывал влияния на амплитудно-временные параметры миниатюрных токов концевой пластинки, что говорило о том, что все модификации временного хода многоквантовых токов имеют пресинаптическую природу. В соответствии с этим предположением 4-аминопиридин к 20-30 мин увеличивал частоту спонтанной квантовой секреции до $420 \pm 30\%$ ($n=5$) от исходного уровня. Этот эффект совпадал по времени с фазой замедления времени роста токов и отражал, по-видимому, рост внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Влияние ритмической стимуляции. В условиях блока калиевых каналов 4-аминопиридином еще большая десинхронизация наблюдалась при переходе от базовой частоты стимуляции 0,033 Гц к 10 Гц. В этом случае вызванное стимуляцией увеличение времени роста многоквантовых токов составило $34 \pm 6\%$. Аналогичное увеличение времени роста токов наблюдалось в

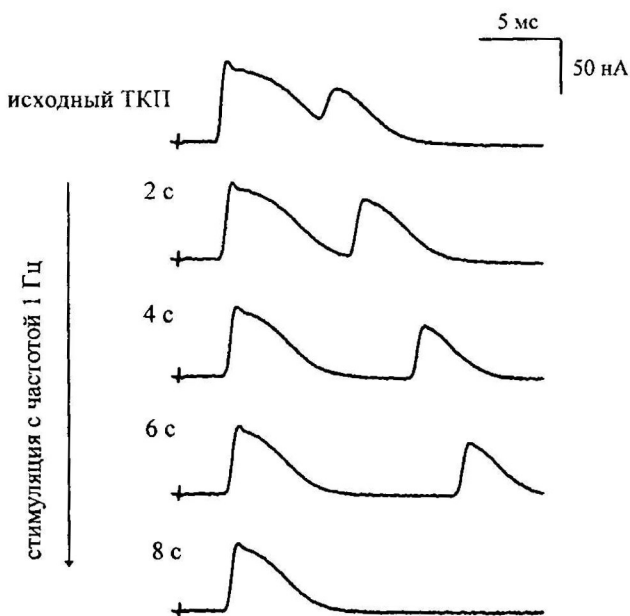


Рис.2. Влияние ритмической стимуляции с частотой 1 Гц на повторную активность, вызванную 0,1 мМ 4-аминопиридина.

наших экспериментах при действии 10 мкМ брадикинина и 5 мМ кофеина, агентов, также увеличивающих внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} . Еще более сильное влияние ритмическая активность оказывала на повторные токи концевой пластинки.

Оказалось, что при повышении частоты с исходной 0,03 Гц до 1 Гц и выше интервал между первым и повторным током концевой пластинки увеличивался, и при достижении величины в 15-20 мс повторный ответ скачкообразно (без уменьшения амплитуды) исчезал (рис.2). Этот процесс ускорялся при увеличении частоты стимуляции. Поскольку 4-аминопиридин не влияет на кальций-активируемые калиевые каналы (A.Mallart, 1984; Meir et al., 1999), этот эффект, наиболее вероятно, связан с повышением активности именно этого типа каналов в результате вхождения большого количества ионов кальция в терминаль.

Влияние внеклеточной концентрации ионов кальция и калия.

Если исчезновение дополнительных повторных ответов при ритмической стимуляции было обусловлено усилением входа кальция в клетку и активацией кальций-активируемых каналов, то такой же результат можно было ожидать и при увеличении концентрации ионов кальция в физиологическом растворе. Действительно, в наших экспериментах увеличение концентрации кальция от исходного значения 1,8 мМ до 5,4 мМ (именно в этом диапазоне наиболее эффективно активируются кальций-активируемые калиевые каналы – A.Mallart, 1984) приводило к устранению повторной активности. Менее эффективно было уменьшение концентрации внеклеточного кальция, хотя при полном устранении кальция перед исчезновением секреторного процесса также наблюдали опережающее устранение повторного сигнала. Если количественно эффект выразить как отношение числа клеток с повторными ответами к общему количеству, то зависимость имеет колоколообразный вид с максимумом в области физиологических концентраций. Аналогичный вид имела зависимость повторной активности от внеклеточной концентрации ионов калия. Эффект повышенной концентрации калия хорошо объясняется повышением входа ионов кальция в терминаль, тогда как исчезновение повторной активности при снижении калия в растворе обусловлено, по-видимому, гиперполяризацией терминали. Таким образом, повторная активность наиболее ярко выражена при физиологических концентрациях ионов кальция и калия. Как увеличение, так и снижение концентрации этих ионов уменьшает вероятность возникновения повторной активности.

Влияние блока входящего кальциевого тока. Повышение концентрации ионов кальция в растворе могло увеличивать и амплитуду входящего кальциевого тока в терминали. Для исследования роли кальциевого тока в явлении повторной активности исследовали влияние неорганических блокаторов кальциевых каналов – ионы кадмия и магния и органического блокатора верапамила. Действие этих агентов оказалось качественно различным. Так, кадмий (50 мкМ) эффективно уменьшал амплитуду токов концевой пластинки в результате

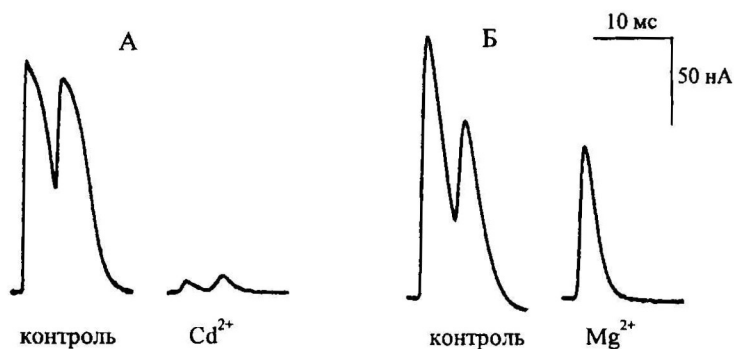


Рис.3. Токи концевой пластинки при действии ионов кадмия (А) и магния (Б) на фоне 0,1 мМ 4-аминопиридина.

блока входа кальция в терминаль, но не устранял повторную активность даже при снижении вызванной секреции с сотни до нескольких квантов и не изменял интервала между вызванным и повторным ответами (рис.3А). Эффект полностью отмывался раствором, не содержащим ионов кадмия. Органический блокатор кальциевых каналов верапамил (35 мкМ), также как и Cd^{2+} , не влиял на повторную активность. В отличие от этого, добавление ионов магния в концентрации 10 мМ приводило к исчезновению дополнительных токов концевой пластинки уже при незначительном (на 30-40%) снижении амплитуды первого

вызванного сигнала (рис.3Б). Этому предшествовало увеличение межсигнального интервала до 12-15мс. Важно отметить, что эффект ионов магния ускорялся при увеличении частоты стимуляции, то есть был зависимым от активности.

Сравнение действия этих агентов позволяет сделать вывод, что входящий кальциевый ток, блокируемый ионами кадмия, не оказывает непосредственного влияния на повторную активность, а ионы магния способны входить внутрь клетки, что и приводит к устранению повторной активности, по-видимому, за счет нарушения внутриклеточных кальций-зависимых процессов. Полученные нами данные свидетельствуют против гипотезы о прямом участии кальциевого тока терминали в генерации повторной активности (E.Silinsky, 2000).

Действие холинергических агентов и уровня поляризации постсинаптической мембраны. В нервно-мышечных синапсах тепловых повторная активность может быть вызвана ингибированием ацетилхолинэстеразы (АХЭ), фермента, разрушающего ацетилхолин (АХ) в результате увеличения концентрации эндогенного АХ в синаптической щели (М.Miyamoto, 1978). В наших экспериментах в нервно-мышечном соединении лягушки ингибирование АХЭ само по себе не приводило к появлению повторных ответов ни в одном из исследованных ($n=61$) синапсов. Однако, прозерин (3 мкМ), введенный на фоне действия 0,1 мМ 4-аминопиридина, усиливал повторную активность, что проявлялось в виде увеличения числа повторных ответов с одного-двух до трех-пяти ($n=8$) в ответ на одиночное раздражение нерва (рис.4А). Это наблюдение свидетельствовало о возможном вовлечении эндогенного АХ в модуляцию повторной активности. Другим способом проверки такой возможности было блокирование холинорецепторов d-тубокурарином. Оказалось, что, действительно, d-тубокурарин (10 мкМ) устраняет повторную активность, вызванную 4-аминопиридином, во всех исследованных ($n=18$) синапсах (рис. 4Б). Это соответствует тому, что d-тубокурарин устраняет пресинаптическое действие экзогенных холиномиметиков

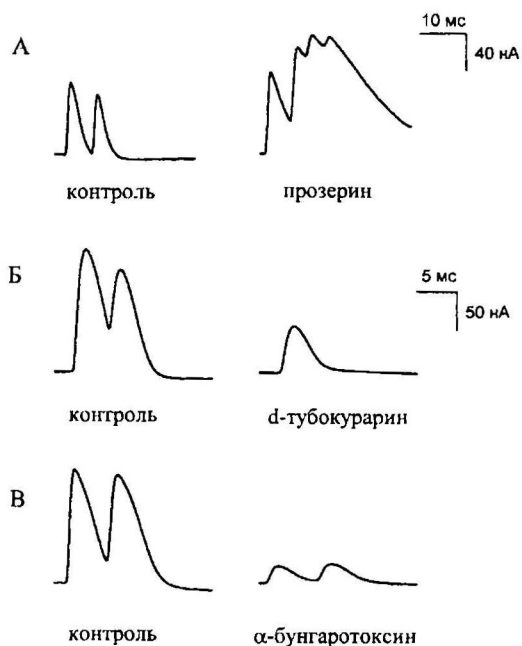


Рис.4. Влияние на повторную активность прозерина (А), d-тубокумарина (Б) и α-бунгаротоксина (В).

(Е.Е.Никольский, 1992). Интересно то, что другой блокатор холинорецепторов, α-бунгаротоксин (1 мкМ), не устранял повторную активность даже при снижении амплитуды ответов в 10-15 раз (рис. 4В). Важно подчеркнуть, что этот токсин не блокирует нейрональные холинорецепторы (за исключением гомоолигомеров, образованных α7 субъединицей – S.Vijayaraghavan, 1992). Это позволяет предположить, что выделяемый из нервного окончания эндогенный АХ участвует в модуляции повторной активности, причем обратная связь осуществляется через пресинаптические α-бунгаротоксин нечувствительные холинорецепторы нейронального типа. В результате экспериментов на мышцах теплокровных были

высказаны предположения о том, что повторная активность вызывается ионами калия, выходящими из мышечного волокна при его активации (R.Holfeld, 1981). Для проверки такого предположения изучали влияние на повторную активность величины мембранного потенциала постсинаптической мембраны. Оказалось, что изменение потенциала фиксации постсинаптической мембраны в диапазоне от -60 до $+30$ мВ, вызывающее не только закономерные изменения амплитуды, но и направленности постсинаптического тока, не влияет ни на число повторных ответов, ни даже на межсигнальные интервалы между вызванным и повторными токами. Этот факт свидетельствовал против вовлеченности ионов калия постсинаптического происхождения в инициацию повторной активности в синапсах лягушки. Кроме того, вариации тока фиксации позволили исключить и другие возможные постсинаптические причины возникновения повторной активности, обусловленные величиной и длительностью постсинаптического тока.

Еще более прямые доказательства пресинаптического происхождения повторной активности были получены при фокальном отведении токов нервного окончания и постсинаптических ответов внеклеточным электродом. При внеклеточном отведении оказалось, что каждому повторному постсинаптическому ответу предшествует потенциал действия нервного окончания. Интересно то, что амплитуда повторного потенциала действия была тем выше, чем больше был интервал между вызванным и повторным сигналом, что, по-видимому, отражает устранение натриевой инактивации (Ходоров, 1975). Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что феномен повторной активности имеет пресинаптическую природу.

Действие других блокаторов калиевых каналов и каналов, активируемых гиперполяризацией. В этой серии экспериментов мы выясняли, связана ли повторная активность исключительно с А-типом калиевых каналов или ее можно вызвать путем блока каналов задержанного выпрямления и кальций активируемых калиевых каналов, также представленных в терминали (А.Л.Зефилов, И.А.Халилов, 1985; Bright & Mallart, 1985).

Оказалось, что тетраэтиламмоний, блокирующий, в основном, каналы задержанного выпрямления и кальций-активируемые каналы (Mallart, 1984, Meir et al., 1999), также продуцировал повторную активность. Причем число повторных сигналов при действии тетраэтиламмония (5-10 мМ) достигало 10 и более, то есть терминаль в ответ на одиночную стимуляцию проявляла множественную пейсмейкерную активность. Такой же активностью обладал и пирокатехин (0,5 мМ), являющийся продуктом фенольного производства и являющийся распространенным фактором загрязнения окружающей среды. Поскольку тетраэтиламмоний блокирует, по крайней мере, два типа калиевых каналов, включая кальций-активируемые каналы, в следующей серии экспериментов изучали роль последних в возникновении повторной активности. Выяснилось, что специфический блокатор кальций-активируемых калиевых каналов ибериотоксин (50 нМ) не вызывал повторных ответов ни в одном из исследованных синапсов ($n=12$), лишь незначительно (на 15-25%) увеличивая амплитуду токов концевой пластинки. Это указывает на то, что при сохраненной активности потенциалозависимых каналов, блокада кальций-активируемых каналов не способна продуцировать повторную активность.

Известно, что в возникновении ритмической активности в сердце и нейронах важнейшую роль играют неселективные ионные каналы (H-каналы), активирующиеся при гиперполяризации (Khakh & Henderson, 1998). В следующей серии экспериментов изучали роль этого типа каналов, используя недавно предложенный (Lithi et al., 1998) специфический блокатор H-каналов ZD7288 [4-(N-этил-N-фениламино)-1,2-диметил-6-(метиламино)пиримидин]. Выяснилось, что ZD7288 устранял повторную активность, вызванную 4-аминопиридином, что указывает на вовлеченность этого типа каналов в феномен повторной активности.

Мультиэлектродное фокальное отведение от различных участков нервного окончания. Хотя внеклеточное отведение несомненно указывало на пресинаптическую природу повторной активности, оно не позволяло установить, в каком именно участке первоначально возникает повторный потенциал действия.

Поэтому в следующей серии экспериментов для выяснения вопроса о месте возникновения повторной активности с помощью нескольких микроэлектродов, подведенных к одиночному нервному окончанию, отводили токи от миелинизированного и терминального (оголенного) участка нервного окончания. Оказалось, что спайки, предшествующие повторным токам концевой пластинки, возникают первоначально в миелинизированном, а не в терминальном участке нервного окончания ($n=8$; $p=0,002$).

В связи с этим возник вопрос, не может ли повторная активность генерироваться в стволе нерва, содержащего миелинизированные волокна? При отдельном перфузировании нервного ствола раствором, содержащим 4-аминопиридин (мышца находилась в растворе Рингера, недоступном для блокатора), даже при высокой концентрации данного агента (до 1 мМ) повторная активность не выявлялась ни в одном ($n=14$) из синапсов. То, что в стволе нерва даже высокие концентрации 4-аминопиридина не вызывают повторной активности, говорит о том, что для ее возникновения необходим особый участок нерва, обладающий свойствами, отличными от свойств ствола нерва или необходим контакт двух гетерогенных участков. Такой участок имеется в конце двигательного нерва, а именно, в области последних перехватов Ранвье. Именно этот участок непосредственно контактирует с оголенной частью терминали, где, по данным Thesleff & Molgo (1982), имеются высокие сопротивление и емкость мембраны (почти отсутствует ток утечки), способствующие длительной деполяризации. Модельные исследования показывают, что такой участок способен продуцировать повторные потенциалы действия (Б.Ш.Гафуров, Д.С.Шакирьянова, А.Л.Зефилов, 1998).

Известно, что в области двигательного нервного окончания ионные токи могут протекать от 8-10 последних перехватов Ранвье до самой терминали. По данным Mallart (1985), и сама терминаль за счет локальных токов может влиять на электрогенез в миелиновой части на достаточно большом протяжении (до 2 мм). Таким образом, механизм возникновения повторной активности базируется, по-видимому, на ретроградном действии длительного потенциала действия самой терминали на восстановившуюся

возбудимость прилегающую часть миелинизированного нерва. Таким образом, местом возникновения являются, по-видимому, перехваты Ранвье (или геминодальный участок) в конечной миелинизированной части аксона, прилегающие к оголенному нервному окончанию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нервно-мышечный синапс способен продуцировать собственную пейсмекерную активность после однократного раздражения в условиях блока потенциалозависимых калиевых каналов нервного окончания. Согласно нашим данным, механизмом возникновения повторной активности в нервно-мышечном синапсе является протекание локального тока между длительно деполяризованной нервной терминалью и миелинизированной частью аксона, прилегающей к терминали. Этот локальный ток деполяризует расположенную более проксимально по отношению к терминали область аксона, что приводит к генерации повторных регенеративных потенциалов действия натриевой природы, возвращающихся в терминаль и вызывающих повторную секрецию медиатора. Таким образом, проявлению и усилению явления повторной активности будут способствовать все факторы, продляющие деполяризацию терминали с одной стороны, и повышающие возбудимость перехватов Ранвье (и/или геминодального участка) с другой. С этих позиций получают объяснение эффекты ингибирования наиболее быстрых потенциалозависимых калиевых каналов и вовлечение в модуляцию повторной активности эндогенного ацетилхолина и ионных каналов, активируемых гиперполяризацией. Избирательная блокада кальций-активируемых калиевых каналов ибериотоксином при сохраненной активности потенциалозависимых каналов не обладает способностью продуцировать повторную активность. Однако, эти каналы, по-видимому, модулируют феномен повторной активности, что проявляется в её устранении в результате ритмической активности или действия повышенной концентрации ионов кальция.

ВЫВОДЫ:

1. Блокатор калиевых каналов А-типа 4-аминопиридин обладает двухфазным воздействием на параметры вызванных синаптических токов - первоначально синхронизирует квантовый выброс, а затем – десинхронизирует, что проявляется в увеличении времени роста постсинаптических токов, асинхронного выброса квантов медиатора и развитии феномена повторной активности.
2. Повторная активность в нервно-мышечном синапсе проявляется в виде нескольких токов концевой пластинки (интервал 3-20 мс), возникающих в ответ на одиночное раздражение нерва, каждому из которых предшествует повторный потенциал действия нервного окончания. Амплитуда повторного потенциала действия пропорциональна интервалу между повторными ответами.
3. На фоне блока калиевых каналов 4-аминопиридином, стимуляция нерва с частотой более 1 Гц увеличивает интервал между повторными токами и впоследствии устраняет повторные ответы.
4. Повторная активность наиболее ярко выражена при физиологических концентрациях ионов кальция и калия. Как увеличение, так и снижение концентрации этих ионов уменьшает вероятность возникновения повторной активности.
5. Ионы магния устраняют повторную активность, причем этот эффект зависит от предшествующей активности, что указывает на внутриклеточное модулирующее действие этого иона.
6. Блок входа кальция в двигательную терминаль ионами кадмия не влияет на повторную активность даже при подавлении секреции до нескольких квантов, что говорит против прямого участия входящего кальциевого тока в развитии повторной активности. Органический блокатор кальциевых каналов верапамил влияния на повторную активность не оказывает.
7. Эндогенный ацетилхолин способствует усилению повторной активности, поскольку блок холинорецепторов нейронального типа устраняет, а ингибирование ацетилхолинэстеразы усиливает этот феномен. Постсинаптический ток не влияет на повторную активность.
8. Блокатор калиевых каналов задержанного выпрямления и кальций-активируемых каналов тетраэтиламмоний вызывает появление множественной (до 10 и более сигналов на одно

раздражение) повторной активности. Специфический блокатор кальций-активируемых каналов ибериотоксин не обладает способностью продуцировать повторную активность.

9. Специфический блокатор гиперполяризационно-активируемых ионных каналов H-типа ZD7288 устраняет повторную активность, что указывает на вовлеченность каналов этого типа в данный феномен.

10. Местом возникновения повторной активности является конечная миелинизированная часть аксона, так как при мультиэлектродном внеклеточном отведении именно в этой области регистрируется наиболее ранний повторный потенциал действия. В стволе нерва блокаторы калиевых каналов повторной активности не вызывают.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Afzalov R.A., Giniatullin R.A., Kotov N.V., Khiroug L.S. Modelling of transmitter release from motor nerve endings // Abstr. Meeting Neurosci Soc., San-Diego, 1995. P.98.
2. Afzalov R., Giniatullin R., Kotov N. The modeling of calcium-dependent intracellular mechanisms triggering neurotransmitter release // Abstr. Sixth International Summer School on Biophysics. Rovinj, Croatia, 1997, P.123.
3. Афзалов Р.А., Гиниатуллин Р.А., Котов Н.В. Участие кальмодулина в квантовом освобождении медиатора из двигательного нервного окончания // Тезисы научно-практической конференции молодых ученых КГМУ, Казань, 1997, С.7.
4. Khiroug, L.S., Sokolova, E.M., Giniatullin, R.A., Afzalov, R.A., and Nistri, A. Recovery from desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells is modulated by intracellular calcium through distinct second messengers // J. Neurosci., 1998, vol. 18, pp.2458-2466.
5. Гиниатуллин Р.А., Хабибуллина Н.К., Афзалов Р.А. Влияние брадикинина на проведение ритмических серий импульсов через синапс // Бюлл. эксп. биол. мед., 1998, т.126, N9, С.256-258.
6. Афзалов Р.А., Гиниатуллин Р.А., Котов Н.В. Влияние ионов Mg^{2+} и Cd^{2+} на повторную активность в двигательных нервных окончаниях лягушки // Тез. V Всеросс. школы молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии», Казань, 1998, С.26-27.
7. Афзалов Р.А., Гиниатуллин Р.А., Котов Н.В. Эффект «оптимальности» в явлении повторной активности в нервно-мышечном синапсе // Тез. V Всеросс. школы молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии», Казань, 1998, С.27-28.
8. Шарифуллина Э.Р., Талантова М.В., Афзалов Р.А., Выскочил Ф., Гиниатуллин Р.А. Исследование пре- и постсинаптических эффектов блокатора кальциевых каналов верапамила в нервно-мышечном соединении // Российский физиологический журнал, 2000 (в печати).

Афзалов

Тир. 100

Подписано в печать 22.05.2000

Зак. 70-2000

Лаборатория офсетной печати Казгоспедуниверситета
420015, г. Казань, ул. Пушкина, 31

2-00